

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



**RWS Group, LLC**

www.translate.com

340 Brannon Street, 5th Floor

San Francisco, CA 94107

tel: 415-512-8800

fax: 415-512-8982

**TRANSLATION FROM JAPANESE**

- (19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
(11) Japanese Laid-Open Patent Application (Kokai) No. 61-257931  
(12) Official Gazette for Laid-Open Patent Applications (A)
- | (51) | <u>Int. Cl.<sup>4</sup>:</u> | <u>Classification Symbols:</u> | <u>Internal Office Registration Nos.:</u> |
|------|------------------------------|--------------------------------|---|
|      | A 61 K 37/04                 |                                | 7138-4C                                   |
|      | // A 61 K 35/74              |                                | 7138-4C                                   |

(43) Disclosure Date: November 15, 1986

Request for Examination: Not yet submitted

Number of Inventions: 1

(Total of 6 pages [in original])

---

(54) Title of the Invention: **Method for Recovering Interleukin-2 Polypeptides**

- (21) Application No. 60-99262  
(22) Filing Date: May 10, 1985  
(72) Inventor: Naoshi Tsuji  
(72) Inventor: Nobuyuki Sugimoto  
(72) Inventor: Takasuke Nakagawa  
(72) Inventor: Atsushi Kurashige  
(72) Inventor: Ken'ichi Fukuhara  
(71) Applicant: Ajinomoto Co., Ltd.

## **SPECIFICATION**

### **1. Title of the Invention**

Method for Recovering Interleukin-2 Polypeptides

### **2. Claims**

A method for recovering interleukin-2 polypeptides, comprising the five steps of:

a first step in which lysozyme is brought into contact with microbial cells in which interleukin-2 polypeptides accumulate in the form of intracellular particles;

a second step in which the cells brought into contact with the lysozyme are ultrasonically ruptured;

a third step in which the ruptured material is placed in a gravitational field to collect the precipitate;

a fourth step in which the precipitate is placed under weakly oxidizing conditions in a 1 M to 6 M guanidine aqueous solution; and

fifth step in which the interleukin-2 polypeptides dissolved in the guanidine aqueous solution are collected.

### **3. Detailed Description of the Invention**

#### **Field of Industrial Utilization**

The present invention relates to a method for recovering interleukin-2 (IL-2) polypeptides, and in particular to a method for recovering IL-2 polypeptides which have accumulated in the form of particles in microbial cells.

IL-2 is a lymphokine having the action of T-cell promoting factor, and holds promise in medical applications.

#### Prior Art

The method featuring the use of microbes manufactured by recombinant DNA techniques is known as a method for manufacturing IL-2 (European Laid-Open Patent Application 0091539). Attempts to manufacture IL-2 using such microbes result in IL-2 polypeptides which often accumulate in the form of particles in the microbial cells. Complicated steps have been needed to solubilize IL-2 polypeptides which have accumulated in the form of particles so as to recover them in the form of polypeptides having IL-2 activity, but the polypeptides that are obtained have low specific activity, and the yield of polypeptides is not very high.

In another known method for collecting protein which has accumulated in the form of particles in microbial cells, lysozyme is first brought into contact with the microbial cells, the cells are then ultrasonically ruptured, and the protein is then centrifugally separated from the ruptured material (see, for example, *Biotechnology*, pp. 151-152 (February 1985) for bovine growth hormone). It is known that the resulting protein particles can be solubilized using guanidine hydrochloride or the like (see, for example, US Patent 4,476,049 for interferon). It is also known that the two thiol residues in common soluble protein molecules can be oxidized with glutathione or the like to form disulfide bonds (for example, *Biochemistry*, 9, (1970), pp. 5015-5022).

What is not known, however, is what type of method would be suitable for recovering higher yields of polypeptides having a higher specific activity from the IL-2 polypeptides accumulating in the form of particles in microbial cells.

IL-2 polypeptides in particular are more poorly soluble in water than other proteins. Furthermore, when particulate polypeptides are solubilized, three thiol residues are produced per molecule, and these types of polypeptides have no IL-2 activity. It may be necessary to form disulfide bonds from these three thiol residues, but the disulfide bonds must be selectively formed from two of the thiol residues. In this respect, the recovery of IL-2 polypeptides is more complicated than conventional proteins which accumulate in the form of particles.

## Problems Which the Invention Is Intended to Solve

An object of the present invention is thus to find a method allowing IL-2 polypeptides which have accumulated in the form of particles in microbial cells to be recovered in higher yields in the form of soluble, active IL-2 polypeptides having higher specific activity.

## Means Used to Solve the Above-Mentioned Problems

In view of the foregoing, the inventors discovered that polypeptides with higher specific activity can be obtained in higher yields when lysozyme is brought into contact with microbial cells in which IL-2 polypeptides have accumulated in the form of particles, the cells are then ultrasonically ruptured, the ruptured material is placed in a gravitational field to allow the precipitate to be collected, the precipitate is then introduced into 1 M to 6 M guanidine aqueous solution, the solution is placed under weakly oxidizing conditions, and the IL-2 polypeptides dissolved in the guanidine aqueous solution are finally collected.

European Laid-Open Patent Application 0091539 discloses a method for producing IL-2-producing microbes prepared by recombinant DNA techniques, as well as IL-2 polypeptides obtained by the culture of these microbes.

In methods for bringing lysozyme into contact with microbial cells in which IL-2 polypeptides accumulate in the form of particles, the microbial cells are preferably suspended in culture broth or hypotonic buffer (pH 6 to 8) to a wet weight of between 0.005 and 0.2 g/mL, the lysozyme is added to between 2,500 and 50,000 units/mL, and the solution is usually held for at least 30 minutes, preferably at a temperature of between 0 and 30°C. Desirable results are sometimes obtained by adding 0.1 to 100 mμ EDTA to the suspension.

The cells brought into contact with the lysozyme are ultrasonically ruptured (9 to 25 kHz). The device should be an ultrasonic generator commonly used to rupture and homogenize cells or tissue, and either an immersion type or cup type of phone can be used to transmit the ultrasonic waves to the samples. The ultrasonic output is adapted to the ultrasonic generator being used, and usually ranges from 20 W to 1 kW.

The treatment time should be selected according to the amount of liquid being treated, the output, the phone being used, and so forth. The ruptured state of the cells can be readily observed under the microscope. Upon suitable rupturing, the non-particulate cellular structural materials (cell walls, cell membranes, etc.) of the IL-2 polypeptides will be finely fragmented and will not retain their original form. The ultrasonic treatment is exothermic, so the cells should be ruptured at as low a temperature as possible, usually 4°C, to prevent the suspension from undergoing thermal denaturation.

The IL-2 polypeptide particles obtained as a result of the rupturing are placed in a gravitational field and are collected in the form of precipitate. The material should be centrifuged under conditions resulting in the precipitation of the IL-2 polypeptide particles, usually for about 5 minutes at 2,000 to 30,000 × G, and preferably 10,000 × G. It may also be centrifuged with a saccharose or other such density gradient. The precipitate thus obtained usually contains 80% or more IL-2 polypeptides.

The precipitate consisting of the resulting particulate IL-2 polypeptides is suspended or dissolved, preferably to a concentration of between 0.01 and 0.2 g/L, in 1 M to 6 M guanidine solution. Higher yields of IL-2 polypeptides are sometimes obtained when the guanidine solution is diluted to between 1 and 4 M after the particles have been well dissolved in 4 to 6 M guanidine solution. The pH of the guanidine aqueous solution ranges from 6 to 10, and preferably from 7 to 9. The guanidine aqueous solution in which the particulate IL-2 polypeptides have been suspended or dissolved is preferably held at a temperature of between 5 and 45°C.

Guanidine hydrochloride is readily available and is thus usually used, but the guanidine may also be used in the form of other salts or in free form.

The 1 to 6 M guanidine aqueous solution in which the particulate IL-2 polypeptides have been suspended or dissolved is placed under weakly oxidizing conditions. Air or an oxygen-containing gas may be passed through the guanidine aqueous solution to put it under weakly oxidizing conditions, and weakly oxidizing agents such as glutathione, cysteine, mercaptoethanol, dithiothreitol or other thiol compounds (and oxygen or other oxidizing agents) and their disulfide forms may also be added to the aqueous solution. Weakly oxidizing agents may be added to the guanidine aqueous solution at the same time that the particulate IL-2 polypeptides are,

but they may also be added after the IL-2 polypeptides have been dissolved to a certain extent, particularly after 4 to 6 M guanidine has been diluted with water.

The weakly oxidizing agent may be used in excess amounts, but is usually used in a concentration of between 1 and 100 mM, and preferably between 10 and 20 mM. When a disulfide compound is used as the oxidizing agent, it should be mixed with a thiol material. When, for example, glutathione is used, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) should be mixed in a ratio of 5:1 to 20:1. When only reduced glutathione is used, air should be passed through the guanidine aqueous solution.

The reaction liquid is sampled at suitable intervals during the oxidation, which is continued until analysis by reverse phase HPLC reveals that the active IL-2 peak has stopped increasing.

The IL-2 polypeptides dissolved in the guanidine aqueous solution are recovered by a common method. For example, the guanidine aqueous solution may be desalinated by gel filtration, and subjected to column chromatography using an anion exchange resin. The salt concentration can be increased to elute the adsorbed IL-2 polypeptides, and the eluate can be immediately subjected to reverse phase HPLC to purify the product. This allows essentially contamination-free IL-2 polypeptides to be obtained.

#### Operation and Effects of the Invention

The method for recovering IL-2 in the present invention allows IL-2 polypeptides with high specific activity to be obtained in high yields.

#### Practical Example 1

##### IL-2-Producing Microbes

*E. coli* pT9-11/HB101 allowing IL-2 polypeptides to accumulate in the form of intracellular particles was obtained in the following manner (see Figure 1).

That is, interleukin-2 cDNA fragments were obtained by cleavage with PstI from pIL2-50A containing the intact cDNA of IL-2 (European Laid-Open Patent Application) (registered *E. coli*  $\chi$ 1776/pIL2-50A, AJ11996, FERM BP-226), and approximately 300 bp fragments containing the A-T and G-C homopolymers present in the 3' nonstructural gene of the IL-2 cDNA gene were removed by digestion with DraI, resulting in 530 bp fragments. These fragments and BamHI linker, and the larger fragment of the PstI-EcoRI of pBR322 (EcoRI portion blunted with Klenow), were ligated with T<sub>4</sub>DNA, resulting in the construction of a plasmid with the BamHI cleavage site inserted after the nonstructural gene approximately 50 bp downstream of the interleukin-2 structural gene. The plasmid was digested with HgiAI to obtain HgiAI fragments containing the IL-2 gene, and these were treated with DNA polymerase I (Klenow) to cut the nucleotide of the single-stranded portion protruding at the 3' terminal, resulting in blunt ends. These fragments were then cleaved with BamHI to obtain approximately 450 bp fragments.

pDR 720 was used as a plasmid with a trp promoter. pDR 720 incorporates a trp promoter and an operator fragment at the SmaI cleavage site of pKO-1 (D.R. Russell and G.N. Bennett, *Gene*, 20, p. 231 (1982)). The pDR 720 was digested with HpaI and BamHI, resulting in large HpaI-BamHI fragments, which were joined at the trp promoter with a synthetic oligomer (as shown in Figure 1) including GCA coding for the N terminal alanine of the mature IL-2 polypeptide and the protein synthesis initiation codon ATG as well as a SD sequence consisting of AAGG. pMI-9 was then selected out.

pTrpA was meanwhile obtained upon joining DNA having a synthesized trpA terminator sequence with large fragments of PvuII and SalI cleaved fragments from pBR322. The pMI-9 and pTrpA were then digested with EcoRI and BamHI to prepare fragments including the IL-2 gene from the pMI-9 and fragments including the trpA terminator from the pTrpA, and these two fragments were joined to obtain pT9-11. The pT9-11 was then introduced into *E. coli* HB101 (F<sup>-</sup>, hsd S20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL 20 (Sm<sup>r</sup>), xyl-5, m+l-1, supE44,  $\lambda$ ) to obtain pT9-11/HB101.



### Preparation of IL-2 Polypeptide Particles

Cells were aeration cultured for 13 hours at 31°C as the pH was adjusted to 6.2 with ammonia in 300 mL culture medium having the following composition: 2% casamino acid, 0.2% yeast extract, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 2% glucose, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.8 mg/mL L-leucin, 0.8 mg/mL L-proline, 8 mg/mL thiamine, 100 µg/mL ampicillin, and 25 µg/mL streptomycin. Meanwhile, when the O.D. at 660 nm reached about 5.0, 25 µg/mL of 3-indoleacrylic acid was added to express the IL-2 gene.

The cells were then collected and suspended to a wet weight of 0.02 g/mL in 20 mM Tris hydrochloric acid buffer (pH 7.5) containing 50 mM EDTA, lysozyme (by Seikagaku Kogyo, albumin, specific activity > 50,000 U/mg) was added to 1 mg/mL, and the material was held for 30 minutes at 10°C. 20 mL was then ultrasonically treated (50 W) for 10 minutes at 40°C (using a sonicator by Odake Seisakusho) to rupture the cells, and IL-2 polypeptide particles were collected by 5 minutes of centrifugation at 12,000 × G.

### Recovery of Active IL-2 Polypeptides

The resulting IL-2 polypeptide particles were dissolved in 20 mL of 6 M guanidine hydrochloride (Gun-HCl), and the IL-2 polypeptides were quantified by liquid chromatography. Meanwhile, cultured cells which had not been treated with lysozyme and ultrasonically ruptured were solubilized with 6 M Gun-HCl for quantification of IL-2 polypeptides by liquid chromatography. The results are given in Table 1.

Table 1

Treatment	IL-2 yield (%)	IL-2 content of protein
Treated with lysozyme, ultrasonically ruptured, and centrifuged	92	85
Untreated	100	12

A pellet containing the resulting IL-2 polypeptides was dissolved to an IL-2 concentration of 0.3 mg/mL in 0.1 M Tris hydrochloric acid buffer (pH 8.0, hereinafter abbreviated as A) containing 6 M guanidine hydrochloride. The product

was then diluted 3-fold with 0.1 M Tris hydrochloric acid buffer (pH 8.0, hereinafter abbreviated as B), GSH and GSSG were each added to final concentrations of 10 and 1 mM, respectively, and the pH was adjusted to 8 using dilute caustic soda. The product was allowed to stand for 12 hours at room temperature, and the low molecular weight [components] were removed by subjecting the reaction liquid to column chromatography on Sephadex G-25 equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0). The product was allowed to flow through a column packed with CM-Sephadex C-25 that had been equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0), resulting in the adsorption of the IL-2, which was eluted with 0.5 M sodium acetate buffer (pH 5.0).

The resulting IL-2 polypeptide fractions were subjected to reverse phase HPLC (using the method noted in Japanese Laid-Open Patent Application 59-225195), and the IL-2 fractions were separated. Assay using cytotoxic T-lymphocytes revealed that the resulting IL-2 polypeptides had a specific activity of  $4.8 \times 10^7$  U/mg. Examination of the disulfide bond bridge locations using a peptide map revealed locations between Cys-58 and Cys-105, which were the same as native IL-2 (ProNAS, 81 (1984), pp. 6486-6490). The yield of IL-2 polypeptides contained in the pellet was 86%.

#### Practical Example 2

Solutions were prepared with the IL-2 polypeptide concentration and guanidine hydrochloride concentration adjusted to the levels given in Table 2 by varying the volume of buffers A and B relative to the amount of pellet when a pellet which had been solubilized with the buffer A described in Practical Example 1 was diluted with buffer B. The products were treated with GSH and GSSG by the same method as that in Practical Example 1, and the treated liquid was immediately analyzed by reverse phase HPLC to determine the rate of conversion of active IL-2, that is, IL-2 having disulfide bonds between Cys-58 and Cys-105, relative to the total IL-2 polypeptides. The results are given in Table 2.

Table 2: Conversion rate of IL-2 polypeptides to active type

IL-2 concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Guanidine hydrochloride concentration (M)					
	1	1.5	2	2.5	3	3.5
75	79	95	102	95	82	38
150	55	66	84	91	80	31

### Practical Example 3

A pellet containing the IL-2 polypeptides obtained by the method described in Practical Example 1 was dissolved to an IL-2 concentration of 0.3 mg/mL in buffer A, and the resulting solution was then diluted 3-fold with buffer B. The solution was stirred for 12 hours as air was gently passed through. IL-2 fractions were then obtained by desalinization, ion exchange chromatography, and reverse phase HPLC according to the same methods described in Practical Example 2. The resulting IL-2 had a specific activity of  $4.9 \times 10^7$  U/mg, and the location of the disulfide bonds was confirmed between Cys-58 and Cys-105. The yield of IL-2 polypeptides contained in the pellet was 72%.

### Practical Example 4

A pellet containing the IL-2 polypeptides obtained by the method described in Practical Example 1 was suspended in 0.1 M Tris hydrochloric acid buffer (pH 8.0) containing 3 M guanidine hydrochloride, 10 mM GSH, and 1 mM GSSG, and the resulting suspension was gently stirred at room temperature for 24 hours. Insoluble fractions were centrifuged off, and IL-2 fractions were then obtained by desalinization, ion exchange chromatography, and reverse phase HPLC according to the same methods described in Practical Example 2. The resulting IL-2 had a specific activity of  $4.8 \times 10^7$  U/mg, and the location of the disulfide bonds was confirmed between Cys-58 and Cys-105. The yield of IL-2 polypeptides contained in the pellet was 65%.

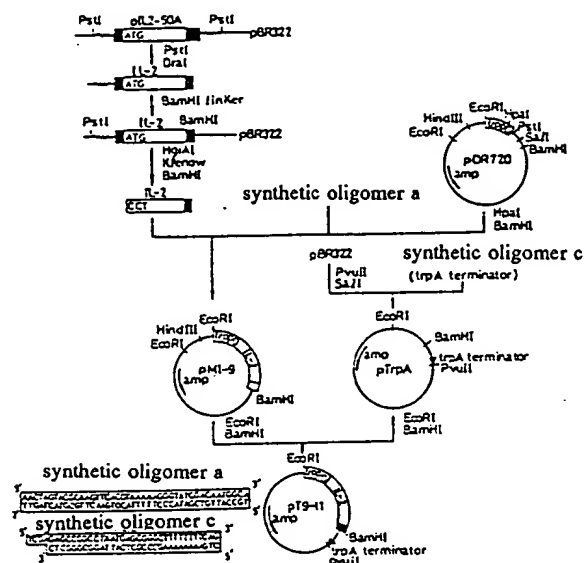
### Practical Example 5

A pellet containing the IL-2 polypeptides obtained by the method described in Practical Example 1 was suspended in 0.1 M Tris hydrochloric acid buffer (pH 8.0) containing 3 M guanidine hydrochloride, and the resulting suspension was stirred for 24 hours at room temperature as air was passed through. Insoluble fractions were centrifuged off, and IL-2 fractions were then obtained by desalinization, ion exchange chromatography, and reverse phase HPLC according to the same methods described in Practical Example 2. The resulting IL-2 had a specific activity of  $5.0 \times 10^7$  U/mg, and the location of the disulfide bonds was confirmed between Cys-58 and Cys-105. The yield of IL-2 polypeptides contained in the pellet was 52%.

#### 4. Brief Description of the Drawings

Figure 1 illustrates the steps for obtaining interleukin-2-producing microbes.

Figure 1



## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-257931

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)11月15日

A 61 K 37/04  
// A 61 K 35/747138-4C  
7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 インターロイキン2ポリペプチドの回収方法

⑰ 特 願 昭60-99262

⑱ 出 願 昭60(1985)5月10日

⑲ 発 明 者	辻	尚	志	川崎市幸区鹿島田958
⑲ 発 明 者	杉	本	信	横浜市保土ヶ谷区川島町590-10
⑲ 発 明 者	中	川	隆	東京都杉並区浜田山3-9-28
⑲ 発 明 者	蔵	重	淳	横浜市鶴見区馬場町5-10-17
⑲ 発 明 者	福	原	健	横浜市戸塚区庄戸3-22-22
⑲ 出 願 人	味の素株式会社			東京都中央区京橋1丁目5番8号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

インターロイキン2ポリペプチドの回収方法

## 2. 特許請求の範囲

インターロイキン2ポリペプチドを細胞内に顆粒状に蓄積している微生物細胞をリゾチームに接触させる第1工程、リゾチームに接触された細胞を超音波により破碎する第2工程、破碎物を重力場に置き沈降物を採取する第3工程、沈降物を1Mから6Mグアニジン水溶液中にて弱い酸化条件に置く第4工程及びグアニジン水溶液中に溶解されているインターロイキン2ポリペプチドを採取する第5工程よりなるインターロイキン2ポリペプチドの回収方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

この発明は、インターロイキン2(IL-2)の回収方法に関し、詳しくは、微生物細胞内に顆粒状に蓄積されているIL-2ポリペプチドを回収する方法に関する。

IL-2は、T細胞増殖因子としての作用を有するリンホカインの一環であり、医薬としての用途が期待されている。

## 従来の技術

IL-2の製造法の一つとして、組換えDNA技術により造成された微生物を用いる方法が知られている(欧州特許出願公開第0091539号)。このような微生物を用いてIL-2を製造しようとする場合、IL-2ポリペプチドは、微生物細胞内に顆粒状に蓄積されることが多い。顆粒状に蓄積されたIL-2ポリペプチドを可溶化し、IL-2活性を有するポリペプチドとして回収するには、従来煩雑な工程を必要とし、また得られたポリペプチドの比活性も低く、更にポリペプチドの回収率も高いものではなかった。

顆粒状に微生物細胞内に蓄積された蛋白質を採取するために、微生物細胞を先ずリゾチームに接触させ、ついで超音波により細胞を破碎し、破碎物より遠心分離により蛋白顆粒を分離する方法が知られている(例えば、牛生長ホルモンについて、

バイオテクノロジー (Biotechnology), 151-154, 1985年2月を参照)。また、得られた蛋白顆粒をグアニジン塩酸塩等により可溶化することも知られている(例えば、インターフェロンについて、米国特許第4,476,049号参照)。更に、一般の可溶性蛋白質分子中の2つのチオール残基をグルタチオン等で酸化してジスルフィド結合を形成せしめることも知られている(例えば、バイオケミストリー (Biochemistry) 9 (1970) 5015~5022)。

しかしながら、微生物細胞内に顆粒状に蓄積されたIL-2ポリペプチドについては、より比活性が高いポリペプチドをより高い回収率で得るには、どのような回収方法が適しているのか、知られていない。

特にIL-2ポリペプチドは、他の蛋白質と比べると、水に溶けにくい。加えて顆粒状ポリペプチドを可溶化したときは、分子中に3箇のチオール残基が生じ、このようなポリペプチドは、IL-2活性を有しない。従って、これら3つのチオール

IL-2ポリペプチドを採取することにより高い比活性のポリペプチドが高い回収率で得られることを見出した。

組換えDNA技術により造成されたIL-2生産能を有する微生物及びその微生物を培養してIL-2ポリペプチドを生成せしめる方法は、欧州特許出願公開第0091539号に記載されている。

IL-2ポリペプチドを顆粒状に蓄積している微生物細胞をリゾチームに接触せしめる方法は、微生物菌体を好ましくは湿重量0.005~0.2g/mlとなるように、pH6から8の低張緩衝液あるいは培養液にけん濁し、リゾチームを2.500から50.000単位/mlとなるように加え、好ましくは0から30℃の範囲に、通常30分以上保てばよい。けん濁液中には0.1から100mMのEDTAを添加すれば、好ましい結果が得られることがある。

リゾチームに接触させた細胞は、9から25kHzの超音波により破碎される。装置は、通常、細胞や組織の破碎・ホモジナイジングに用いられる超音波発生装置を用いればよく、試料に超音波を

残基よりジスルフィド結合を形成せしめる必要があると考えられるが、いずれか二つのチオール残基より選択的にジスルフィド結合を形成せしめなければならない。これらの点から、従来の顆粒状に蓄積された蛋白に比べ、IL-2ポリペプチドの回収については、より困難が予想される。

#### 発明が解決しようとする問題点

従って、本発明の目的は、微生物細胞内に顆粒状に蓄積されたIL-2ポリペプチドを、可溶性のIL-2活性を有するポリペプチドとして、より高い比活性であってより高い回収率で、回収する方法を見出すことにある。

#### 問題点を解決するための手段

叙上のような状況下で本発明者らは、IL-2ポリペプチドを顆粒状に細胞内に蓄積している微生物細胞を、リゾチームと接触せしめた後、超音波にて細胞を破碎し、ついで破碎物を重力場において沈降物を採取し、沈降物を1Mから6Mグアニジン水溶液に入れ、これを弱い酸化的条件下に置き、最後にグアニジン水溶液中に溶解されている

伝達するホーンは投込式のもの、カップ式のもの、いずれも使用できる。超音波出力は、使用する超音波発生装置に適したものでよいが、通常20Wから1kWが用いられる。処理時間は、処理液量、出力、使用するホーン等に応じ適宜選択すればよい。細胞の破碎状態は顕微鏡下に容易に観察することができる。適切な破碎が行なわれると、IL-2ポリペプチドの顆粒以外の細胞構成物(細胞壁、細胞膜等)は、微細な破片となり、もとの形をとどめない。また超音波処理は発熱を伴うので、けん濁液の熱変性を防ぐため細胞の破碎は通常4℃とできるだけ低い温度下で行なわれる。

破碎により得られたIL-2ポリペプチド顆粒は重力場におき、沈降物として採取される。遠心分離はIL-2ポリペプチド顆粒が沈降する条件で行えばよいが、通常2,000~30,000×g、好ましくは10,000×g、5分程度行なわれる。また、蔗糖等の密度勾配遠心分離を行ってもよい。このようにして得られる沈降物は、通常80%以上のIL-2ポリペプチドを含有する。

得られた顆粒状 IL-2 ポリペプチドよりなる沈降物を 1 M から 6 M の範囲のグアニジン溶液中に、好ましくは、0.01 から 0.2 g/l の濃度となるようにけん濁又は溶解する。グアニジン溶液が 4 から 6 M の範囲であるときは、顆粒が充分溶解した後、1 から 4 M になるよう水で希釈した方が IL-2 ポリペプチドの回収率が高いことがある。グアニジン水溶液の出は、6 から 10 の範囲、より好ましくは 7 から 9 の範囲である。また、顆粒状 IL-2 ポリペプチドがけん濁または溶解されているグアニジン水溶液は、温度 5℃ から 45℃ の範囲に置くのが好ましい。

グアニジンは、グアニジン塩酸塩が容易に入手できるので、塩酸塩が通常使用されるが、他の塩又は遊離形であってもよい。

顆粒状 IL-2 ポリペプチドがけん濁又は溶解されている 1 から 6 M グアニジン水溶液は、弱い酸化条件に置かれる。弱い酸化条件に置くには、グアニジン水溶液に空気又は酸素を含む気体を通気してもよく、また、グルタチオン、システイン、

メルカプトエタノール、ジチオスレイトール等のチオール化合物（及び酸素又は他の酸化剤）及びこれらのジスルフィド体のような弱い酸化剤を水溶液に添加してもよい。弱い酸化剤は、顆粒状 IL-2 ポリペプチドと同時にグアニジン水溶液に添加しても良いが、IL-2 ポリペプチドがある程度溶解した後、特に 4 から 6 M グアニジンを水にて希釈した後添加してもよい。

弱い酸化剤は大過剰量使用されるが、通常 1 から 100 mM 好ましくは 10 から 20 mM の濃度範囲で用いられる。ジスルフィド化合物を酸化剤として用いる場合は、そのチオール体と混用するのがよく、例えばグルタチオンを用いる場合には、還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) を好ましくは 5 : 1 ~ 20 : 1 の比混用する。還元型のみを用いるときは、グアニジン水溶液に空気を流すのがよい。

酸化は、反応液を適当な時間間隔でサンプルをとりだし、逆相 HPLC による分析により、活性型 IL-2 のピークの増加が停止する迄続けられる。

かくして、グアニジン水溶液中に溶解された IL-2 ポリペプチドを、通常の方法で回収する。例えば、グアニジン水溶液をゲル透過によって脱塩し、陽イオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーに供する。塩濃度を上昇させることにより、吸着された IL-2 ポリペプチドを溶離せしめ、溶離液を逆相 HPLC に直接負荷することにより精製する。このようにして、実質的に夾雑物を含まない IL-2 ポリペプチドを得ることが出来る。

#### 発明の作用、効果

この発明の IL-2 の回収方法によれば、高い比活性の IL-2 ポリペプチドが、高い回収率で得られる。

#### 実施例 1

##### IL-2 産生微生物の取得

IL-2 ポリペプチドを細胞内に顆粒状に蓄積できるエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) pT9-11/HB101 を次のようにして得た (第 1 図参照)。

即ち、IL-2 全 cDNA を含む pIL2-50A (欧州特

許出願公開 91539 号)、(寄託エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) の 1776/pIL2-50A, AJ11996, FERMBP-226) ~~Nov 303, 305, 1983~~ より PstI で切断しインターロイキン-2 cDNA 断片を得、さらに DraI で消化して IL-2 cDNA 遺伝子の 3' 非相連遺伝子に存在する A-T, G-C ホモポリマーを含む約 300 塩基対の断片を除去したところの 530 塩基対断片を得た。そしてこの断片と BamHI リンカーと、pBR322 の PstI-EcoRI の大きい方の断片 (EcoRI 部位はクレノウで平滑末端にした) とを T<sub>4</sub> DNA リガーゼで連結し、インターロイキン-2 相連遺伝子のおよそ 50 塩基対下流の非相連遺伝子の後に BamHI 切断部位の入ったプラスミドを造成した。そしてこのプラスミドを、HgiA1 で消化し IL-2 遺伝子を含む HgiA1 断片を得、これを DNA ポリメラーゼ I (クレノウ) 処理で 3' 端に突出した単鎖部分のメクレオテッドを削り取り平滑末端にした。そしてさらにこの断片を BamHI で切断して約 450 塩基対の断片を得た。

また、trp プロモーターを搭載したプラスミド

として pDR 720 を使用した。pDR 720 は pKO-1 (Russell, D.R. and Bennett, G.N., Gene, 20, 231 (1982)) の Sma I 切断部位に trp プロモーター、オペレーター断片が組込まれたものである。pDR 720 を Hpa I と BamH I で消化し、大きい Hpa I - BamH I 断片を得、trp プロモーターの 1 部と AAGG なる SD 配列ならびに蛋白合成開始コドン ATG と成熟 IL-2 ポリペプチドの N 末端のアラニンをコードする GCA を含む合成オリゴマーとを第 1 図に示すように連結し pMI-9 を選りだした。

一方、pBR322 の Pvu II と Sal I 切断断片の大きい断片と、合成した trpA ターミネーター配列を持つ DNA とを連結させ pTrpA を得た。そして pMI-9 と pTrpA をともに EcoR I と BamH I で消化し pMI-9 は IL-2 遺伝子を含む方の断片、pTrpA は trpA ターミネーターを含む方の断片をそれぞれ調製し、この 2 者を連結して、pT9-11 を得た。そこで pT9-11 をエシ・リヒア・コリ HB101 (F<sup>-</sup>, hsdS20 (r<sub>S</sub><sup>-</sup>, m<sub>S</sub><sup>-</sup>), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (S<sup>m</sup><sup>r</sup>), xyl-5, m<sup>+</sup>Δ-1, supE44, Δ<sup>-</sup>) に導

入して pT9-11/HB101 を得た。

#### IL-2 ポリペプチド顆粒の調製

細胞は、(2% カザミノ酸, 0.2% 酵母エキス, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 2% グルコース, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.8 mg/ml L-ロイシン, 0.8 mg/ml L-プロリン, 8 mg/ℓ サイアミン, 100 μg/ml アンピシリン, 25 μg/ml ストレプトマイシン) の組成の培地 300 ml 中で、アンモニアで pH を 6.2 に調節しながら 31℃ で 13 時間、通気培養した。途中、660 nm の O.D. がおよそ 5.0 に達した時点で、3-インドールアクリル酸 25 μg/ml を加えて、IL-2 遺伝子を発現させた。

その後、細胞を集め、湿重量 0.02 g/ml になるように、50 mM の EDTA を加えた 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) にけん濁し、1 mg/ml となるようにリゾチーム (生化学工業製、卵白、比活性 > 50,000 U/mg) を加え、10℃ に 30 分保った。次いで、このうち 20 ml を 4℃, 50 W, 10 分間超音波処理して (大岳製作所 Sonicator 使用)

細胞を破砕し、12,000×g, 5 分間遠心分離して、IL-2 ポリペプチドの顆粒を採取した。

#### 活性型 IL-2 ポリペプチドの回収

得られた IL-2 ポリペプチド顆粒を、6 M グアニジン塩酸塩 (Gun·HCl) 20 ml に溶解して、液体クロマトグラフィーにより IL-2 ポリペプチド量を測定した。一方、培養終了後の細胞をリゾチーム処理、超音波による細胞破砕をせずに直接 6 M Gun·HCl により可溶化したものを調製し、液体クロマトグラフィーにより IL-2 ポリペプチド量を測定した。これらの結果を表 1 に示す。

表 1

処 理	IL-2 回収率 (%)	タンパク質中の IL-2 含量率 (%)
リゾチーム処理, 超音波処理, 遠心分離処理	92	85
上記処理なし	100	12

得られた IL-2 ポリペプチドを含むペレットを、6 M 塩酸グアニジンを含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0, 以下 A と略す) に、IL-2 濃度 0.3 mg/ml となるように溶解した。その後、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0, 以下、B と略す) で、3 倍に希釈し、GSH 及び GSSG をそれぞれ、最終濃度 10 mM 及び 1 mM となるように加えた後、希釈性ソーダを用いて、pH を 8 に調整した。室温下、12 時間静止した後反応液 0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したセフアデックス G-25 を用いるカラムクロマトグラフィーに供して低分子を除去した。0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した CM-セフアデックス C-25 を充填したカラムに通液し、IL-2 を吸着させた後に、0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で、IL-2 を溶出した。

得られた IL-2 ポリペプチド画分を逆相 HPLC (特開昭 59-225195 に記載されている方法を使用した) に供し、IL-2 画分を分取した。得られた IL-2 ポリペプチドは、細胞障害性 T-リン



パ球株を用いる活性検定法では  $4.8 \times 10^7$  U/μg の比活性を示した。またペプチドマップ法により、ジスルフィド結合の架橋位置を調べたところ、天然型 IL-2 (ProNAS. 81 (1984) 6486-6490) と同じく Cys-58 と Cys-105 間にあることが判った。また、ペレット中に含まれる IL-2 ポリペプチドからの回収率は 86% であった。

#### 実施例 2

実施例 1 に記した緩衝液 A で可溶化したペレットを緩衝液 B で希釈する際に、ペレット量に対する A, B の容量を変化させることにより IL-2 ポリペプチド濃度及び塩酸グアニジン濃度を表 2 に示した値になるように調節した溶液を作成した。これを、実施例 1 に記載した方法と同様にして、GSH と GSSG で処理し、処理液を直接逆相 HPLC で分析することによって、総 IL-2 ポリペプチドに対する活性型、すなわち Cys-58 - Cys-105 間にジスルフィド結合を持つ IL-2 の変換率を求めた。結果を表 2 に記した。

表 2 IL-2 ポリペプチドの活性型への変換率 (%)

IL-2 濃度 (μg/ml)	塩酸グアニジン濃度 (M)					
	1	1.5	2	2.5	3	3.5
75	79	95	102	95	82	38
150	55	66	84	91	80	31

#### 実施例 3

実施例 1 に記載した方法によって得た IL-2 ポリペプチドを含むペレットを、緩衝液 A に IL-2 濃度 0.3 μg/ml となるように溶解し、続いて緩衝液 B で 3 倍に希釈した。この溶液に空気をおだやかに通じながら 12 時間攪拌した。しかる後に、実施例 2 に記した方法により、脱塩、イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC 工程を経て、IL-2 画分を得た。得られた IL-2 は  $4.9 \times 10^7$  U/μg の比活性を示し、また、ジスルフィド結合位置は、

Cys-58 - Cys-105 間であることが確認された。なおペレット中に含まれる IL-2 ポリペプチドからの回収率は 72% であった。

#### 実施例 4

実施例 1 に記載した方法によって得られた IL-2 ポリペプチドを含むペレットを、3 M 塩酸グアニジン、10 mM GSH、1 mM GSSG を含む 0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、室温下、24 時間、緩やかに攪拌した。遠心分離によって不溶性画分を除去した後実施例 2 に記した方法によって脱塩、イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC を行ない、IL-2 画分を得た。得られた IL-2 は、 $4.8 \times 10^7$  U/μg の比活性を示し、ジスルフィド結合を Cys-58 - 105 間に有していた。また、ペレット中に含まれる IL-2 ポリペプチドからの回収率は 65% であった。

#### 実施例 5

実施例 1 に記載した方法によって得られた IL-2 ポリペプチドを含むペレットを 3 M 塩酸グアニジンを含む 0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) に

懸濁し、室温下空気を通じながら、24 時間攪拌した。遠心分離によって不溶性画分を除去した後、実施例 2 に記した方法により脱塩、イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC を行ない IL-2 画分を得た。得られた IL-2 は、 $5.0 \times 10^7$  U/μg の比活性を示し、ジスルフィド結合を Cys-58 - 105 間に有していた。またペレット中に含まれる IL-2 ポリペプチドからの回収率は、52% であった。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、インターロイキン 2 産生微生物の取得経過説明図である。

特許出願人 味の素株式会社

第 1 図

